



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA - FCE
FARMÁCIA

RAFAEL MARTINS DE MORAIS

**POLIMORFISMO GENÉTICO DE *XRCC1* E *ERCC2/XPD* E ASSOCIAÇÕES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO NO DISTRITO FEDERAL.**

CEILÂNDIA, DF
2015

RAFAEL MARTINS DE MORAIS

**POLIMORFISMO GENÉTICO DE *XRCC1* E *ERCC2/XPD* E ASSOCIAÇÕES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO NO DISTRITO FEDERAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido
à Faculdade de Ceilândia da Universidade de
Brasília, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do Grau de Bacharel
em Farmácia

Área de Concentração: Farmácia

Orientador: Prof.^a Dra. Izabel Cristina
Rodrigues da Silva

CEILÂNDIA, DF
2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

RAFAEL MARTINS DE MORAIS

**POLIMORFISMO GENÉTICO DE *XRCC1* E *ERCC2/XPD* E ASSOCIAÇÕES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO NO DISTRITO FEDERAL.**

Banca Examinadora

Orientador: Prof.^a Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

Prof.^a Dra. Vivian Taís Cipriano
(Faculdade UniCEUB)

CEILÂNDIA, DF
2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo sopro de vida e, aqui, ofereço a minha vida em tua mãos.

Aos meus queridos pais, Sidrach Dantas de Moraes e Nazaré Martins Ferreira de Moraes e a minha amada irmã Danielle Martins de Moraes, pelo estímulo e incentivo, e por terem me permitido dedicar aos estudos desde o início. Obrigado por tudo.

À minha namorada, Fernanda Ferreira de Andrade, e família, pelo amor incondicional, carinho, companheirismo e amizade que me deram em toda a graduação e que estenderá por toda a minha vida.

A toda minha família, em especial, a minha tia Nelci Martins Ferreira, por ter contribuído para a minha educação ao longo dos últimos anos.

Aos meus amigos, com os quais conheci, sofri, batalhei e aprendi a amar o universo do curso de Farmácia e por terem feito parte da minha vida nesses últimos anos: Samuel, Diogo, Yohanna, Mayrla, Déborah, Camilla, Beatriz, Ana Gabriela, Anna Paula e Natane e Thaís. Boa sorte a todos.

Aos meus grandes amigos de infância Rodrigo, Guilherme, Gustavo, Bleno, Diego, Renan, Ronan, Alan, Michael Diego, Carlos e Lucas, que serão meus eternamente. Contem comigo sempre.

Deixo um forte abraço ao meu primeiro orientador, Prof. Dr. Marcelo Henrique Souza, que me mostrou um pouco do que é a Ciência. Obrigado.

Agradeço a minha atual orientadora, Prof.^a Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, pelo direcionamento e aprendizado. Sinto-me honrado em tê-la ao meu lado. Muito obrigado.

Aos meus amigos da empresa Imagens Médicas de Brasília (IMEB), Caiubi Rodrigues, Sarah Martins, Lucas Soares, João Felipe e Alaor Barra.

À Universidade de Brasília e ao seu corpo docente pelo aprendizado e dedicação.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos Drs. Luzitano Ferreira e Carlos Barros pelas amostras dos pacientes.

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença multifatorial, com alterações na regulação imune. Fatores genéticos contribuem para a suscetibilidade e prognóstico desta disfunção. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a associação entre suscetibilidade e manifestações clínicas em LES e os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs): Arg399Gln no gene *XRCC1* e Lys751Gln no *ERCC2/XPD*. Para isto, foram recrutados 257 portadores de LES e 128 controles. A genotipagem foi conduzida pelo método PCR-RFLP. A análise dos dados aponta que a frequência do genótipo heterozigoto A/G para *XRCC1*/Arg399Gln diferiu significativamente entre os portadores de LES e os controles ($P < 0,001$). Verificou-se a que a distribuição deste genótipo relacionou-se com algumas manifestações clínicas: rash malar - ACR (83,5%); fotossensibilidade - ACR (82,9%); úlceras mucosas (75,0%) e anti-dsDNA alterado (68,8%). Para o polimorfismo Lys751Gln de *ERCC2/XPD*, dados indicam que a frequência do heterozigoto A/C diferiu significativamente entre os pacientes portadores de LES do controle ($P = 0,001$). Este perfil heterozigoto relacionou-se com as seguintes manifestações clínicas: síndrome nefrótica (100%); edema (87,9%); elevação da creatinina (85,4%); anti-dsDNA (84,4%); cilindrúria (84,0%); sistema complemento alterado (82,5%); leucocitúria (81,9%); derrame pleural (81,0%); hematúria (80,6%); úlceras mucosas (80,4%); úlceras mucosas/nasais - ACR (79,6%); serosites - ACR (79,3%); nefrites - ACR (77,7%); rash malar - ACR (75,2%); alterações imunológicas (72,3%) e fotossensibilidade (70,4%). Estes resultados indicam que ambos SNPs descritos estão associados com a susceptibilidade e o prognóstico de LES.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico. Polimorfismo. *XRCC1*. *ERCC2/XPD*. Manifestações clínicas.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifactorial disease with changes in immune regulation. Genetic factors contribute to susceptibility and prognosis of this disorder. Therefore, the objective of this study was to investigate the association between susceptibility and clinical manifestations in SLE and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs): Arg399Gln in *XRCC1* and Lys751Gln gene in *ERCC2/XPD*. For this, they were recruited 257 patients with SLE and 128 healthy controls. Genotyping was performed by PCR-RFLP method. Data analysis shows that the frequency of heterozygous genotype A/G for *XRCC1*/Arg399Gln differ significantly between patients with SLE than healthy controls ($P < 0.001$). It was found that the distribution of this genotype was related to some clinical manifestations: malar rash - ACR (83.5%); photosensitivity - ACR (82.9%); mucosal ulcers (75.0%) and anti-dsDNA changed (68.8%). For the Lys751Gln polymorphism *ERCC2/XPD* data indicate that the frequency of heterozygous A/C differ significantly between patients with SLE than healthy control ($P = 0.001$). This heterozygous profile was related to the following clinical manifestations: nephrotic syndrome (100%); swelling (87.9%); increased creatinine (85.4%); anti-dsDNA (84.4%); cylindruria (84.0%); altered complement system (82.5%); leukocyturia (81.9%); pleural effusion (81.0%); hematuria (80.6%); mucosal ulcers (80.4%); mucosal/nasal ulcers - ACR (79.6%); serositis - ACR (79.3%); nephritis - ACR (77.7%); malar rash - ACR (75.2%); immunological changes (72.3%) and photosensitivity (70.4%). These results indicate that both described SNPs are associated with SLE susceptibility and prognosis.

Keywords: Systemic lupus erythematosus. Polymorphism. *XRCC1*. *ERCC2/XPD*. Clinical manifestations.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	METODOLOGIA	10
2.1	Participantes da pesquisa	10
2.2	Extração de DNA e genotipagem	12
2.3	Análise estatística	13
3	RESULTADOS	14
3.1	Frequência genotípica e alélica do polimorfismo Arg399Gln no gene XRCC1 em LES	14
3.2	Frequência genotípica e alélica do polimorfismo Lys751Gln no gene ERCC2/XPD em LES.....	14
3.3	Frequência genotípica e alélica e manifestações clínicas em pacientes com LES.....	17
4	DISCUSSÃO.....	18
5	CONCLUSÃO	25
6	REFERÊNCIAS	27
	ANEXO I.....	35

1 INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica inflamatória sistêmica e autoimune, caracterizada por apresentar diversos autoanticorpos, que resultam em deposição de imunocomplexos (ICs) (Gurevitz et al., 2013). Tal evento implica danos que atingem múltiplos órgãos e sistemas (Sutton et al., 2013). No Brasil, estima-se incidência de LES em torno de 8,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano, de acordo com estudo epidemiológico realizado na Região Nordeste (BRASIL, 2013).

As principais manifestações clínicas acontecem na pele, como a fotossensibilidade, que causam erupções cutâneas observadas por reação anormal à luz solar, além das úlceras mucosas, geralmente orais e/ou nasofaríngeas e o eritema malar (*rash* malar), que são lesões eritematosas fixas na região malar, apresentando-se planas ou em relevo (Aringer and Kuhn, 2014).

Outros problemas estão relacionados às articulações, como artralgia isolada e artrites (Ball and Bell, 2012); a comprometimentos hematológicos, como anemia hemolítica, leucopenia, trombocitopenia e linfopenia (O'Brien et al., 2013); a problemas renais, como síndrome nefrótica, na qual há registros de proteinúria (Desai et al., 2013); além de prejuízos que podem acometer os sistemas pulmonar (Ni et al., 2014), cardíaco (Mavrogeni et al., 2013) e vascular (Sokalski et al., 2013), podendo haver até mesmo alterações neurológicas (Bhattacharyya and Helfgott, 2014) e abortos espontâneos (Barnado et al., 2014; Santana et al., 2015).

Apesar de esta doença autoimune multifatorial ter causa ainda não completamente estabelecida, sabe-se que há influência de fatores hormonais (Tiskievicz et al., 2011) e ambientais (Barbhaiya and Costenbader, 2014; Zandman-Goddard et al., 2012), além dos genéticos (Deng and Tsao, 2014; Guerra et al., 2012). Ademais, variações geográficas podem determinar diferentes características da doença, bem como comprometimentos imunológicos e acometimento de órgãos, o que acarreta mudanças no tratamento e prognóstico (Borchers et al., 2010; Lee and Bae, 2010).

Ainda na questão ambiental, diversos fatores externos, como drogas, radiação ionizante, agentes químicos, vírus e outros microrganismos, podem gerar danos

celulares. Isso pode causar prejuízos ao material genético e, em resposta a esta agressão, ocorre a expressão aumentada de genes, proteínas de manutenção e reparo celular (Engstrom et al., 2009; Krawczak and Cooper, 1991; Matullo et al., 2003; Rutter and Silberg, 2002).

Existem diversos genes responsáveis pelo reparo celular, entre eles o *XRCC1* (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*) que está localizado na posição 19q13.2 (Caldecott, 2003; Thompson et al., 1990). Esse gene possui papel fundamental no reparo do rompimento de fitas simples do DNA por oxidação das células humanas, de forma a ligar-se à enzima DNA ligase III (Caldecott, 2003; Masson et al., 1998) .

No mecanismo de ação do gene *XRCC1* também há envolvimento de outras enzimas, como a DNA polimerase- β e a poli ADP-ribose polimerase. A deficiência desse gene o torna hipersensível a danos ao DNA. Esses danos podem ser provenientes de radiação ionizante ou de espécies reativas de oxigênios alquilantes (Hu, 2004; Wang et al., 2003)

Outro gene é o *ERCC2/XPD* (*Excision Repair Cross-Complementation Group 2/ Xeroderma Pigmentosum Complementary Group D*), também localizado no cromossomo 19, mas na posição 19q13.3, e participa da construção da proteína *XPD* (Jaspers, 1997; Lamerdin et al., 1996). Essa proteína está envolvida na formação do complexo TFIIH (fator de transcrição II humano), que possui função na transcrição gênica e no reparo ao DNA danificado (Coin et al., 1999; Kuper et al., 2014). Assim como a *XRCC1*, esse gene regula a atividade de diversos outros genes (Abdulrahman et al., 2013).

Deficiências no reparo produzido pela expressão do gene *ERCC2/XPD* podem resultar em aumento dos níveis dos chamados complexos imunitários patogênicos, desencadeando fortes respostas autoimunes, tais como anticorpos antinucleares. Mutações na proteína *XPD* podem diminuir a atividade de reparo celular, transcrição e apoptose e causar disfunções hormonais e respostas anormais das células. Na literatura constam terem sido mapeadas mais de 100 mutações nesse gene (Benhamou and Sarasin, 2002)

Com isso, fatores genéticos têm papel cada vez mais importante no diagnóstico, tratamento e prognóstico de doenças autoimunes, como o LES. Diversos estudos descrevem que pacientes portadores desta patologia possuem alta deficiência em diferentes genes envolvidos no reparo celular. Desta forma, há

possibilidade de que tais polimorfismos possam contribuir para o LES (Jahantigh et al., 2015; Warchol et al., 2012).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi identificar a distribuição dos Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) na região codante dos genes *XRCC1* e *ERCC2/XPD* em pacientes portadores de LES, e compará-los com um grupo controle, em uma população brasileira. Também foi investigado se o polimorfismo dos genes está associado com a suscetibilidade à patologia autoimune e suas características clínicas, porque há possibilidade de que esse contribua para o LES.

2 METODOLOGIA

2.1 Participantes da pesquisa

Os participantes da pesquisa foram divididos em grupo caso e grupo controle, totalizando 385 indivíduos ao todo, sendo o grupo caso constituído de pacientes portadores de LES (257 mulheres, entre os 18 e 76 anos, idade de 37 ± 12 anos) e o grupo controle sem descrição de critérios para doenças autoimunes foram incluídos neste estudo (128 mulheres entre 18 e 74 anos, com idade média de 35 ± 13 anos).

Os pacientes foram recrutados em uma unidade hospitalar do Distrito Federal. Todos os pacientes preencheram o número mínimo de critérios de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR), publicados em 1982 e revisados em 1997, aceitos universalmente para LES. Os critérios ACR estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Critérios de classificação do LES baseado no *American College of Rheumatology (ACR)* revisados em 1997.

<i>Critério</i>	<i>Definição</i>
1º Rash malar	Lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
2º Rash discoide	Lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
3º Fotossensibilidade	Autorrelato ou observação de erupções cutâneas causadas por reação anormal à luz solar.
4º Úlceras orais/nasais	Ulceração oral ou nasofaríngea encontrada.
5º Artrite	Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas.
6º Serosite	Pleurite ou pericardite.
7º Desordens renais	Proteinúria persistente >0,5 g/24 horas ou cilindrúria anormal
8º Desordens neurológicas	Convulsões ou psicose.
9º Desordens hematológicas	Anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia ou trombocitopenia.
10º Desordens imunológicas	Presença de anticorpos anti-DNA, anticorpos anti-Sm, anticorpos APL, ou falso teste positivo para sífilis.
11º Anticorpo antinuclear	Título anormal de anticorpos antinucleares.

Fonte: Inês e colaboradores (2014) – adaptado.

Prontuários dos pacientes com LES foram cuidadosamente estudados, sendo que, comprometimento renal, perfil dos autoanticorpos e outras características clínicas foram registradas. O comprometimento renal foi definido como proteinúria considerada maior que 0,5g/24 horas ou comprovada por biópsia de nefrite lúpica.

Foram utilizados valores mais altos para o título de anti-dsDNA e o menor para o nível C3. O número de critérios do ACR durante LES atendidos, o índice de *SLE Disease Activity* (SLEDAI) e o Lúpus Internacional de Colaboração Clínicas (SLICC) / Índice de Danos ACR foram determinados em cada paciente.

A coleta de dados foi executada após a aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (ANEXO 1).

2.2 Extração de DNA e genotipagem

Todas as amostras foram coletadas por punção venosa para isolamento do DNA. O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do kit *Invisorb Spin Blood – Mini Kit* (250) da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A concentração de DNA foi determinada através da corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. O rendimento médio alcançado foi de 20 ng/μL. Em seguida, o DNA diluído foi submetido à estratégia PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction*) para estudo da distribuição dos SNPs.

A técnica da PCR permite que a região selecionada do genoma para o gene *XRCC1* (éxon 10 do gene, mutação 399 G>A; Arg399Gln/A1196G; rs25487) ou *ERCC2/XPD* (éxon 23 do gene, mutação 751 A>C; Lys751Gln/A18911C; rs13181) seja amplificada milhões de vezes. As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliar o polimorfismos foram, respectivamente:

*XRCC1*_399 F: 5'- TTGTGCTTTCTCTGTGTCCA -3';

*XRCC1*_399 R: 5' - TCCTCCAGCCTTTTCTGATA -3'; (Nissar et al., 2013)

ERCC2/XPD _751 F: 5' CCCCCTCTCCCTTTCCTCTGTTC 3';

*ERCC2/XPD*_751 R: 5' GGACCTGAGCCCCCACTAACG 3' (Mitra et al., 2009).

As condições de termociclagem foram 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 57°C (*XRCC1*) ou 62°C(*XPD*) por 45 segundos e 72°C por 60 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. O equipamento utilizado foi o Termociclador Techne modelo TC-512.

Em cada reação foram utilizados 4,0μL de DNA genômico na concentração final de 2,5ng/μL; 2,5μL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl); 0,5μL de MgCl₂ 50mM (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil), 0,5μL de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs; 2,5mM; (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil); 0,5μL de Taq-Polimerase, (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil), 5U/μL); 1,5μL de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse* (10μM, *IDT technologies*); completando com água Milli-Q para um volume final de

25µL por reação. O produto desta PCR foi um fragmento de 615pb para *XRCC1* e 161pb para *ERCC2/XPD*

O produto da PCR para rs25487 (*XRCC1*) foi digerido com a enzima de restrição *MspI* (*New England Biolabs*, Inc. Beverly, MA, USA). O alelo Arg (G) cria um novo sítio de restrição, e o fragmento de 615pb é clivado em dois de 374pb e 241pb; o alelo Gln (A) não é clivado pela enzima, e, assim, o polimorfismo foi dividido em genótipo de clivagem (G/G), heterozigoto (A/G), e genótipo de não clivagem (A/A). Para montagem do sistema de digestão foram utilizados: 10,0µL da PCR; 2,0µL de tampão 10x NEB2.1 (*Biolabs*); 1µL de enzima *MspI* (10U/µL), completando com água Milli-Q para um volume final de 20µL por reação. O sistema foi mantido a 37°C por 3 horas.

Por outro lado, o produto da PCR para rs13181 (*ERC22/XPD*) foi digerido com a enzima de restrição *Pst I* (*New England Biolabs*, Inc. Beverly, MA, USA). O alelo Gln (C) cria um novo sítio de restrição, e o fragmento de 161pb é clivado em dois de 120pb e 41pb; o alelo Lys (A) não é clivado pela enzima. Assim, o polimorfismo foi dividido em genótipo de clivagem (C/C), heterozigoto (A/C) e genótipo de não clivagem (A/A). Para montagem do sistema de digestão foram utilizados: 10,0µL da PCR; 2,0µL de tampão 10x NEB3.1 (*Biolabs*); 1µL de enzima *Pst I* (10U/µL), completando com água Milli-Q para um volume final de 20µL por reação. O sistema foi mantido a 37°C por 3 horas.

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídio na potência de 100W por 30 minutos.

2.3 Análise estatística

A aderência ao equilíbrio Hardy-Weinberg para a frequência genotípica em controles foi analisada pelo teste do qui-quadrado com um grau de liberdade. As frequências genotípica e alélica nos pacientes com LES foram comparadas ao grupo controle por meio do teste qui-quadrado em modelos recessivos e dominantes. A associação de características clínicas para cada genótipo foi analisada com o teste qui-quadrado e foi adotado o nível de significância de 5%.

Também foram calculadas Odds ratio (OR) das frequências alélicas e genotípicas, com intervalo de confiança (IC) de 95%. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. RESULTADOS

3.1 Frequência genotípica e alélica do polimorfismo Arg399Gln no gene XRCC1 em LES

A frequência genotípica do polimorfismo Arg399Gln no gene *XRCC1* nos controles estava em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P = 0,611$). A distribuição genotípica deste polimorfismo é estatisticamente diferente em relação aos participantes de LES quando comparados com os indivíduos controles (genótipos A/A, A/G e G/G – 8, 161 e 88, respectivamente – contra 11, 49 e 68, respectivamente, $\chi^2 = 22,020$; $P = 0,000$). Porém, não houve diferença significativa nas frequências alélicas entre pacientes com LES e controles (alelo A, G: 177 e 337 contra 71 e 185, respectivamente, OR = 1,37, $\chi^2 = 3,515$ e $P = 0,065$), o que está representado na Tabela 2.

3.2 Frequência genotípica e alélica do polimorfismo Lys751Gln no gene ERCC2/XPD em LES

A frequência genotípica do polimorfismo Lys751Gln no gene *ERCC2/XPD* nos controles estava em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P = 0,089$). A distribuição genotípica foi significativamente diferente em relação aos participantes de LES contra os indivíduos controles (genótipos C/C, C/A, e A/A 6; 164 e 87 contra 6; 59 e 63, respectivamente, $\chi^2 = 11,328$, $P = 0,003$). Não houve diferença significativa nas frequências alélicas entre pacientes com LES e controles (alelo C, A: 338 e 176 versus 185 e 71, respectivamente, OR = 0,74, $\chi^2 = 3,321$, $P = 0,068$), conforme representado

na Tabela 2. O alelo de maior frequência em LES foi o A (65,8%) quando comparado com o C (34,2%).

Tabela 2: Polimorfismo dos genes *XRCC1* e *ERCC2/XPD* em pacientes com LES e controles

		Grupos				P	χ^2	OR (IC 95%)
Polimorfismo	Genótipo	LES		Controle				
		N	%	N	%			
XRCC1 Arg399Gln	A/A (Gln/Gln)	8	3,1	11	8,6	0,000*	22,020	N/A
	A/G (Arg/Gln)	161	62,6	49	38,3			
	G/G (Arg/Arg)	88	34,2	68	53,1			
	A/G (Arg/Gln)	161	62,6	49	38,3	0,000*	20,458	2,71 (1,75-4,19)
	AA/GG	96	37,4	79	61,7			
	A (Gln)	177	34,4	71	27,7	0,065	3,515	1,37 (0,99-1,90)
	G (Arg)	337	65,6	185	72,3			
ERCC2/XPD Lys751Gln	C/C (Gln/Gln)	6	2,3	6	4,7	0,003*	11,328	N/A
	A/C (Lys/Gln)	164	63,8	59	46,1			
	A/A (Lys/Lys)	87	33,9	63	49,2			
	A/C (Lys/Gln)	164	63,8	59	46,1	0,001*	11,007	2,06 (1,34-3,17)
	AA/CC	93	36,2	69	53,9			
	A (Lys)	338	65,8	185	72,3	0,068	3,321	0,74 (0,53-1,02)
	C (Gln)	176	34,2	71	27,7			

* P<0,05; N/A: não se aplica

3.3 Frequência genotípica e alélica e manifestações clínicas em pacientes com LES

Foram analisadas associações heterozigóticas estatisticamente significantes a respeito dos polimorfismos Arg399Gln em *XRCC1* e Lys751Gln em *ERCC2/XPD*, que estão descritas na Tabela 3. Para o polimorfismo Arg399Gln do gene *XRCC1* foram descritas associações com os seguintes sintomas clínicos: *rash* malar - ACR (83,5%) (P = 0,000; OR = 7,47; IC = 4,18-13,33); fotossensibilidade (82,9%; P = 0,000; OR = 9,69; IC = 5,40-17,41); úlceras mucosas (75,0%) (P = 0,031; OR = 2,07; IC = 1,06-4,03) e anti-dsDNA positivo (68,8%; P = 0,043; OR = 1,69; IC = 1,01-2,81).

As manifestações clínicas associadas ao genótipo A/C do polimorfismo Lys751Gln no gene *ERCC2/XPD* foram: síndrome nefrótica (100%) ($P = 0,000$); edema (87,9%; $P = 0,000$; OR = 7,01; IC = 3,53-14,30); elevação da creatinina (85,4%; $P = 0,001$; OR = 3,93; IC = 1,59-9,75); anti-dsDNA (84,4%; $P = 0,000$; OR = 7,00; IC = 3,86-12,69); cilindrúria (84,0%; $P = 0,000$; OR = 4,36; IC = 2,25-8,46); sistema complemento alterado (82,5%; $P = 0,000$; OR = 68,23; IC = 23,21-200,67); leucocitúria (81,9%; $P = 0,000$; OR = 4,29; IC = 2,38-7,74); derrame pleural (81,0%; $P = 0,001$; OR = 3,05; IC = 1,53-6,08); hematúria (80,6%; $P = 0,000$; OR = 3,87; IC = 2,18-6,68); úlcera mucosa (80,4%; $P = 0,004$; OR = 2,82; IC = 1,38-5,77); úlceras mucosas/nasais - ACR (79,6%; $P = 0,007$; OR = 2,59; IC = 1,22-5,47); serosites - ACR (79,3%; $P = 0,000$; OR = 3,02; IC = 1,66-5,51); nefrites - ACR (77,7%; $P = 0,000$; OR = 3,54; IC = 2,06-6,07); *rash* malar - ACR (75,2%; $P = 0,000$; OR = 2,84; IC = 1,68-4,82); alterações imunológicas (72,3%; $P = 0,000$; OR = 3,00; IC = 1,75-5,17); e fotossensibilidade (70,4%; $P = 0,006$; OR = 2,00; IC = 1,19-3,62).

A frequência dos genótipos heterozigotos A/G, do polimorfismo Arg399Gln no gene *XRCC1* e A/C, do polimorfismo Lys751Gln no gene *ERCC2/XPD*, e os demais genótipos dos pacientes, assim como as respectivas associações com as manifestações clínicas, estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição da presença das manifestações clínicas em pacientes com LES conforme a frequência genotípicas de *XRCC1* e *ERCC2/XPD*

Manifestação clínica	XRCC1 Arg399Gln						ERCC2/XPD Lys751Gln					
	A/G		AA/GG		P	OR (IC)	A/C		AA/CC		P	OR (IC)
	N	%	N	%			N	%	N	%		
Úlcera mucosa #	42	75,0%	14	25,0%	0,031*	2,07 (1,06-4,03)	45	80,4%	11	19,6%	0,004*	2,82 (1,38-5,77)
Derrame pleural	38	60,3%	25	39,7%	0,384	0,88 (0,49-1,57)	51	81,0%	12	19,0%	0,001*	3,05 (1,53-6,08)
Edema #	64	70,3%	27	29,7%	0,079	1,69 (0,98-2,91)	80	87,9%	11	12,1%	0,000*	7,01 (3,53-14,30)
Elevação da creatinina #	30	73,2%	11	26,8%	0,088	1,77 (0,84-3,72)	35	85,4%	6	14,6%	0,001*	3,93 (1,59-9,75)
Leucocitúria #	69	65,7%	36	34,3%	0,238	1,25(0,75-2,10)	86	81,9%	19	18,1%	0,000*	4,29 (2,38-7,74)
Cilindrúria #	56	69,1%	25	30,9%	0,093	1,51 (0,86-2,65)	68	84,0%	13	16,0%	0,000*	4,36 (2,25-8,46)
Síndrome Nefrótica #	122	68,9%	77	31,1%	0,160	1,43 (0,77-2,64)	116	100%	83	0,0%	0,000*	N/A
Hematúria #	73	67,6%	35	32,4%	0,163	1,45(0,77-2,64)	87	80,6%	21	19,4%	0,000*	3,87 (2,18-6,68)
Anti-dsDNA #	88	68,8%	40	31,3%	0,043*	1,69 (1,01-2,81)	108	84,4%	20	15,6%	0,000*	7,00 (3,86-12,69)
Sistema complemento alterado #	126	64,9%	68	35,1%	0,146	1,42 (0,80-2,56)	160	82,5%	34	17,5%	0,000*	68,23 (23,21-200,67)
Rash malar - ACR #	111	83,5%	22	16,5%	0,000*	7,47 (4,18-13,33)	100	75,2%	33	24,8%	0,000*	2,84 (1,68-4,82)
Fotossensibilidade - ACR #	126	82,9%	26	17,1%	0,000*	9,69 (5,40-17,41)	107	70,4%	45	29,6%	0,006*	2,00 (1,19-3,62)
Serosites - ACR #	56	64,4%	31	35,6%	0,394	1,18 (0,65-1,91)	69	79,3%	18	20,7%	0,000*	3,02 (1,66-5,51)
Nefrites - ACR #	86	66,2%	44	33,8%	0,147	1,35 (0,82-2,25)	101	77,7%	29	22,3%	0,000*	3,54 (2,06-6,07)
Alterações imunológicas - ACR #	104	60,1%	69	39,9%	0,143	0,71 (0,41-1,24)	125	72,3%	48	27,7%	0,000*	3,00 (1,75-5,17)
Úlceras mucosas/nasais - ACR #	36	73,5%	13	26,5%	0,056	1,84 (0,92-3,68)	39	79,6%	10	20,4%	0,007*	2,59 (1,22-5,47)

A presença dos dois genótipos heterozigotos contra qualquer outra combinação genética está associada com a característica clínica de LES.

* P<0,05.

4. DISCUSSÃO

Avaliar fatores genéticos envolvidos no lúpus eritematoso sistêmico tem sido cada vez mais frequente na pesquisa e prática clínica. Nesse trabalho, foi explorada a possibilidade de a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes *XRCC1* e *ERCC2/XPD* (Tabela 2) estar relacionada com manifestações clínicas dos pacientes portadores da doença (Tabela 3).

A primeira etapa do estudo foi a análise da frequência de SNP no gene *XRCC1* códon 399 na população do Distrito Federal. A frequência de genótipos heterozigóticos (A/G) no códon 399 do gene *XRCC1* no nosso trabalho totalizou 62,6% dos participantes envolvidos, tendo maior frequência em relação aos estudos de Lin et al (50,6%) e Bassi et al (21,8%) em LES; Cho et al (37,2%) em carcinoma nasofaríngeo; Trabulus et al (35%) em doença renal em fase terminal (Bassi et al., 2008; Cho et al., 2003; Lin et al., 2009; Trabulus et al., 2012).

No tocante à associação deste polimorfismo com as características clínicas, houve forte associação entre o genótipo A/G com a presença de *rash* malar - ACR ($P = 0,000$; OR = 7,47; IC = 4,18-13,33), fotossensibilidade ($P = 0,000$; OR = 9,69; IC = 5,40-17,41) e úlceras mucosas ($P = 0,031$; OR = 2,07; IC = 1,06-4,03), seguida de considerável relação de anti-dsDNA ($P = 0,043$; OR = 1,69; IC = 1,01-2,81) nos participantes deste estudo.

Os resultados do trabalho de Lin et al. (fotossensibilidade, 57,6%, e *rash* malar, 55,2%) quando comparados ao nosso estudo (82,9% e 83,5%, respectivamente), apresentaram menores relações. Apesar de o nosso estudo também ter tais relações, não constatamos artrite e desordens hematológicas associadas ao genótipo A/G. Ainda, no tocante às relações citadas, o autor sugere que são necessários estudos mais detalhados para investigar os mecanismos moleculares controladas por *XRCC1* e suas variantes genéticas (Lin et al., 2009).

Na literatura, diversos autores descrevem que as alterações hematológicas são frequentes em LES (sem avaliação do *background* genético), sendo as mais comuns: anemias (50,0 a 80,0% dos casos); leucopenias (20,0 a 60,0%); neutropenias (aproximadamente 50% dos pacientes); linfopenia (20,0 a 80,0% dos casos); trombocitopenia (8,0 a 32,0%), entre outras (García Tello et al., 2002).

Rothfield explica que os pacientes os portadores de LES geralmente apresentam, durante o curso da doença, uma ou mais alterações hematológicas (Rothfield et al., 2006). Todos esses fatores estão relacionados com o prognóstico da doença.

Por outro lado, apesar de a frequência de artrite em pacientes de LES ser frequentemente relatada na literatura, neste estudo verificamos que os polimorfismos estudados parecem não ter relação de causalidade com tal manifestação clínica (dados não mostrados),

Sabe-se que no LES há forte relação com alterações eritematosas. No nosso trabalho contribuímos para uma reflexão do *background* genético sobre esta associação. Grande parte dos participantes com mutações genéticas A/G no códon 399 do gene *XRCC1* foram diagnosticados com *rash* malar - ACR (83,5%), fotossensibilidade - ACR (82,9%) e úlceras mucosas (75,0%). A sensibilidade à luz solar aumentada faz com que apareçam manchas, principalmente na região das bochechas e dorso do nariz, podendo gerar até cicatrizes mais profundas.

O aumento da frequência de manifestações dermatológicas pode ser explicado possivelmente pela localização demográfica da população do Distrito Federal, fortalecida pela grande influência da incidência de luz ultravioleta durante boa parte do ano, acarretando principalmente alterações dermatológicas, como as citadas anteriormente.

No estudo feito em 1995, com 685 participantes, em São Paulo, Brasil, sem analisar fatores genéticos, 51% foram diagnosticados com *rash* malar e 47% com fotossensibilidade, sem que os participantes apresentassem úlceras mucosas (Chahade et al., 1995).

Mais recentemente, em 2012, um estudo constituído por 888 participantes realizado na cidade de São Paulo, Brasil, um dos maiores sobre a doença e de maior impacto no país, ainda sem avaliar polimorfismos genéticos, comprovou a frequência de *rash* malar de 83,2%, seguida de fotossensibilidade, 76,9%, e presença de manifestações com úlceras mucosas, 23,2% (Borba et al., 2013).

Sabe-se que a radiação ultravioleta (UV) é um forte indutor de lúpus e, juntamente com fatores genéticos, corrobora o aumento da suscetibilidade à doença. O último estudo citado possui grande relação com o nosso trabalho, que pode ser explicada pelo menor decurso de tempo entre os dois e pelo aumento da temperatura mundial nos últimos anos. Segundo a *National Oceanic and Atmospheric*

Administration (NOAA), 2014 foi o ano mais quente do planeta desde o início das medições, em 1850 (Change, 2015).

Fatores imunológicos são preponderantes no LES. O polimorfismo Arg399Gln do gene *XRCC1* foi significativamente associado com a presença do autoanticorpos anti-DNA de dupla hélice (anti-dsDNA), sendo sua frequência de 68,8%, superior aos mesmos trabalhos citados anteriormente, com 47,0% e 35,1% respectivamente. Embora tenha sido relatado em outras patologias, esse autoanticorpo está correlacionado com alguns aspectos patológicos e prognósticos importantes da doença.

Além disso, a pesquisa do anti-dsDNA é altamente útil para o diagnóstico e seguimento da doença, principalmente em casos em que há complicações renais, dentre elas a proteinúria. A maior causa de morbidade e mortalidade de pacientes com LES são os problemas renais, principalmente nefrite lúpica (Rezende et al., 2014).

O gene *XRCC1* não está somente associado com doenças autoimunes, mas existe possibilidade de relação com outros tipos de doenças e diversos cânceres, como de mama (Rodrigues et al., 2011), colo uretral (Rossit et al., 2002), esôfago (Rezende et al., 2014), nasofaríngeo, fatores prognósticos pós-radioterapia (Seibold et al., 2015), além de ser presumível modificador de risco significativo para cirrose alcoólica (Rossit et al., 2002).

Por isso, estudar cada vez mais o gene *XRCC1* e relacioná-lo com diversos tipos de doenças e seus respectivos sintomas clínicos trará, então, benefícios à saúde, do diagnóstico ao prognóstico.

O gene *ERCC2/XPD* está associado a fotossensibilidade, a aumento na pigmentação na pele, a cânceres de pele, surdez e comprometimentos no sistema nervoso, como degeneração neuronal e redução progressiva das capacidades mentais (Rajaraman et al., 2010). É um gene considerado essencial, por influenciar na morte embrionária (Friedberg, 2003). A maioria das mutações *XPD* estão associados a fenótipos mais severos (Stefanini et al., 2010). Em contrapartida, elevada expressão nesse gene pode reduzir aberrações genéticas, aumentando a sobrevida do paciente (Zhou et al., 2015).

A *XPD* helicase é uma das proteínas mais importantes na reparação de danos ao DNA induzidas por tabaco. Presume-se que polimorfismos nesse gene pode afetar o risco de câncer relacionado ao fumo. A presença do alelo Gln e do genótipo C/C

relacionado com câncer de pulmão foi sugerida em estudo, porém o resultado foi baseado em pequeno número de indivíduos, 14 casos e 6 controles (Liang et al., 2003).

Em nosso trabalho, o que mais evidenciamos quanto ao polimorfismo Lys751Gln em *ERCC2/XPD* foram os fatores relacionados ao sistema renal. A presença de síndrome nefrótica, nefrites, hematúria, cilindrúria, leucocitúria e elevação da creatinina, além dos demais sintomas, foram confirmados estatisticamente na população. Não há muitos trabalhos relacionando esse polimorfismo com o LES, mas há vasta literatura descrevendo estas manifestações clínicas.

No estudo de revisão bibliográfica de Tianyuan Xiong e colaboradores (2014) foram comparados 15 trabalhos com polimorfismo Lys751Gln no gene *ERCC2/XPD* e risco de câncer de bexiga. Os resultados encontrados sugeriram que o polimorfismo nesse gene pode contribuir para uma ligeira associação com o risco de câncer de bexiga no modelo recessivo (Xiong et al., 2014)

Nefrite (glomerulonefrite) é um processo inflamatório que afeta estruturas renais, principalmente o glomérulo. A nefrite lúpica é caracterizada por ser mediada pelos complexos imunitários. Como já dito, as nefrites são as principais causas de morbidades relatadas em pacientes de LES. Além disso, fatores como baixo nível socioeconômico podem interferir diretamente na qualidade de vida dos pacientes, merecendo por isso atenção especial. Registrou-se que aproximadamente de 40 a 70% dos pacientes de LES irão desenvolver nefrite lúpica (Mohan and Putterman, 2015).

Em estudo realizado com 100 pacientes atendidos pelo Serviço de Reumatologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, o intervalo médio entre o diagnóstico de LES e nefrite foi de $2,32 \pm 4,70$ anos (Melo et al., 2009). Esse dado é de extrema importância, pois contribui para o acompanhamento do curso da doença nos pacientes.

Intensa imunossupressão com esteroides e ciclofosfamida pode alcançar excelentes resultados a longo prazo no tratamento de glomerulonefrite em LES (Mok et al., 2006). Porém, ao longo dos últimos 50 anos, novas estratégias para o manejo terapêutico da nefrite lúpica vêm sendo apresentadas, variando quanto a regiões demográficas, valores socioeconômicos e diferenças étnicas (Chan, 2014).

A síndrome nefrótica (nefroze) é caracterizada pela grande eliminação de proteína na urina ($>3,5\text{g}$ por $1,73\text{m}^2$ de superfície corporal em 24 horas ou acima de 50mg/kg de peso em 24 horas), além de edema, hipoproteïnemia e dislipidemia. (Nachman PH, Jennette C, Falk RJ. Primary glomerular disease. In: Brenner BM. Brenner & Rector's The Kidney). O diagnóstico é feito por meio de critérios clínicos, laboratoriais e por exames histopatológicos de biópsia renal (BRASIL, 2013).

A presença anormal de células vermelhas do sangue na urina é denominada hematúria. No estudo retrospectivo de 1981 a 1997, realizado pelo *Rheumatology Research Center*, Tehran University of Medical Sciences, com 1.700 pacientes de LES, 700 pacientes apresentaram hematúria e 31 foram identificados com hematúria isolada, que é observada principalmente quando LES e nefrite estão ativos. No entanto, não houve correlação significativa entre hematúria isolada com complemento alterado e anti-dsDNA.

No nosso trabalho, 80,6% pacientes com genótipo A/C para o polimorfismo Lys751Gln gene *ERCC2/XPD* apresentaram hematúria. Hematúria positiva tem sido associada com nefrite lúpica ativa e anti-dsDNA positivo (Esdaile et al., 1991; Mitjavila et al., 1996).

A cilindrúria é a presença de cilindros anormais na urina. Esse foi outro sintoma clínico que apresentou diferença significativa em nosso trabalho, no qual pacientes com perfil heterozigótico para Lys751Gln em *ERCC2/XPD* apresentaram cilindrúria correspondente a 84%.

Em Belém do Pará, Brasil, estudo retrospectivo realizado com 104 portadores de LES, atendidos de 1990 a 1999, apresentou frequência de 43,04% dos pacientes com presença de cilindros na urina (Sauma et al., 2004).

A estimativa da função renal em pacientes com LES é de suma importância na determinação da gravidade, progressão e prognóstico do acometimento renal, assim como no manejo farmacológico e ajuste de doses do fármaco utilizado (Martínez-Martínez et al., 2012). A função renal pode ser avaliada por meio da depuração renal (*clearance*).

O *clearance* é utilizado para aferir velocidade e eficiência da filtração renal. Quando existe piora na função renal há aumento de excreção de creatinina tubular, superestimando a taxa de filtração glomerular (TFG).

O padrão ouro consiste em quantificação de marcadores exógenos, como inulina, iotalamato ou ácido tetracético de etilenodiamina (EDTA). Porém, são

métodos considerados caros e que geralmente indisponíveis nos laboratórios clínicos, tornando-se inviáveis na prática clínica. No estudo envolvendo 86 pacientes com nefrite lúpica, 61,6% apresentaram taxa de filtração glomerular $<60\text{mL de plasma/min/1,73m}^2$.

No mesmo trabalho foi relatado que pacientes com $\text{TFG} \geq 60\text{mL de plasma/min/1,73m}^2$, ou seja, normal, tinham prognóstico significativamente melhor quando comparado aos que tinham taxa $<60\text{mL de plasma/min/1,73m}^2$. Além disso, também obtiveram maior sobrevida (Patel et al., 2011).

Outra metodologia que auxilia a avaliação da função renal é a dosagem de creatinina sanguínea. Com a ingestão de proteínas provenientes da dieta, há produção de creatina fosfato pelo fígado. O consumo da creatina fosfato pelos músculos para geração energética produzirá creatinina, que, por sua vez, é eliminada pelos rins. Por meio da dosagem desse componente também é possível avaliar a função renal.

O sistema complemento (SC) participa da ativação de processos inflamatórios contra infecções no corpo humano. É constituído por um conjunto de proteínas plasmáticas, células inflamatórias, lise celular, amplificação de resposta, entre outros, e é ativado por diversos mecanismos, resumidamente explicados pelas vias clássica e alternativa. A atuação inadequada do SC pode causar graves danos a tecidos, como acontece no LES.

Polimorfismos genéticos envolvendo o SC podem acometer componentes da membrana celular e dos receptores e proteínas solúveis de controle imunitário. Mutações em genes cruciais podem, por sua apropriada ação, levar ao desenvolvimento de patologias como LES, artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença celíaca, entre outras. No LES, há deposição dos complexos imunes, podendo afetar múltiplos órgãos.

Deficiências nos primeiros passos da via clássica do sistema complemento estão associadas ao LES, comprometendo a solubilização e remoção dos complexos (Iturry-Yamamoto and Portinho, 2001). Além disso, o sistema complemento pode afetar tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. Proteínas do SC, como C3 e C4, são utilizadas para monitorar o curso da doença (Trolborg et al., 2015).

O fator nefrítico C3 é um exemplo de deficiência que ocorre no SC e parece estar associado com glomerulonefrite, também relacionada no nosso trabalho. O mecanismo de ação se dá pela estabilização da C3 convertase, levando a consumo

exacerbado de C3 e remoção imprópria dos complexos imunes, causando processo inflamatório no glomérulo renal.

Componentes como C1, C2 e C4 vêm sendo associados com o LES. Ademais, deficiências hereditárias homozigóticas dos componentes C1q, C1r, C1s, C2 e C4 parecem estar fortemente associadas com essa patologia (da Rosa Utiyama et al., 2004)..

No nosso estudo, 82,5% dos indivíduos heterozigotos A/C para o polimorfismo Lys751Gln do gene *ERCC2/XPD* apresentaram o SC alterado. Isso aumenta ainda mais a importância da monitoração desse sistema crucial no processo imune, contribuindo para outros trabalhos envolvendo doenças autoimunes, como o LES.

Sabe-se que o funcionamento inadequado do SC é fator de risco para o acometimento renal. Diversas manifestações clínicas decorrentes do polimorfismo Lys751Gln do gene *ERCC2/XPD*, relacionadas ao sistema renal, apresentadas em nosso trabalho, podem ser consequências do SC alterado ($P = 0,000$; $OR = 68,23$; $IC = 23,21-200,67$).

No presente estudo, os dois polimorfismos em tela apresentaram diferenças estatísticas entre o grupo caso e o controle na população analisada. Portanto, correlacioná-los é interessante, uma vez que poderia ajudar na prevenção e avaliação do curso da doença.

Em dois estudos analisados por Chen S. et al, 2002, os polimorfismos do gene *ERCC2/XPD* foram correlacionados com o *XRCC1*. Foi verificado o aumento significativo do risco de câncer de pulmão entre pessoas com cinco ou seis alelos variantes (envolvendo *ERCC2/XPD* Asp312Asn, *ERCC2/XPD* Lys751Gln e *XRCC1* Arg399Gln) em comparação a pacientes sem alelos variantes (Chen et al., 2002; Zhou et al., 2003).

No nosso trabalho, os polimorfismos dos genes estudados também foram correlacionados. Todas as manifestações clínicas apresentadas nos dois genes analisados tiveram relação estatisticamente significativa, exceto no tocante a derrame pleural.

Xiangdong Wang e colaboradores (2015) descreveram associação do cromossomo 19 no câncer de pulmão, relatando fortes evidências dos genes *ERCC2/XPD* e *XRCC1* no envolvimento desse tipo de câncer (Wang et al., 2015)

Artigo de revisão bibliográfica publicado no *Jornal Molecular Vision*, 2015 defende a visão de que os genes *XRCC1* e *ERCC2/XPD* podem desempenhar papel

importante na suscetibilidade a catarata relacionada à idade (Chi et al., 2015). Esses e outros trabalhos corroboram a relação do cromossomo 19 no envolvimento de diversas doenças.

O teste anti-dsDNA é bastante específico para LES. Entretanto, de 50% a 70% dos pacientes apresentam anti-dsDNA positivo. Por isso, além de ser suporte para o diagnóstico, esse teste é utilizado para monitorização da doença, visto que aumentos dos níveis desses autoanticorpos coincidem com crises dos sintomas (Rekvig, 2015). No nosso trabalho, a frequência de anti-dsDNA A/G para o gene *XRCC1* foi de 68,8% e a frequência A/C para o gene *ERCC2/XPD* foi de 84,4%.

Sabe-se que a presença de anti-dsDNA no sangue está fortemente associada com o LES e que o *rash* malar é um dos seus sinais mais recorrentes. Assim, é possível que polimorfismos no cromossomo 19 estejam relacionados diretamente com o LES. Para isso, são necessários mais estudos correlacionando os dois genes analisados com outros polimorfismos presentes nesse cromossomo.

Outra manifestação clínica avaliada no nosso estudo foi o edema. Esse sintoma é comum em pacientes de LES, ocorrendo principalmente nas mãos, braços, pernas e pés, resultado do excesso e acúmulo de líquidos nos tecidos corporais. No LES, o edema pode ser uma manifestação de trombose venosa ou decorrência da hipoalbuminemia. Há relatos de casos incomuns de pacientes de LES com edema generalizado, resultando em efusões serosas e obstruções linfáticas.

5. CONCLUSÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico é uma doença sistêmica, caracterizada por profundas alterações na regulação imune, capaz de acometer diversos tecidos, com acúmulo de imunocomplexos. Mutações no cromossomo 19 parecem estar relacionadas com o LES. Os polimorfismos dos genes *XRCC1* e *ERCC2/XPD* analisados neste trabalho estão localizados nesse cromossomo, em regiões próximas, o que reforça a teoria de ligação gênica destes *loci* e prognóstico da doença, pois a distribuição dos polimorfismos nos portadores de LES é diferente da dos controles.

Polimorfismos nos genes *XRCC1* e *ERCC2/XPD* em pacientes portadores de LES e suas manifestações clínicas foram estatisticamente relacionados com a

população brasileira analisada. O polimorfismo Arg399Gln do gene *XRCC1* eleva o risco do portador de LES de desenvolver fotossensibilidade, *rash* malar e úlceras mucosas. Em relação ao polimorfismo Lys751Gln no gene *ERCC2/XPD*, o risco de o paciente apresentar SC alterado é de 68 vezes. Para outras manifestações clínicas, como edema e anti-dsDNA, o risco é 7 vezes maior do que pacientes portadores de LES sem alterações heterozigóticas nesse gene.

Desordens renais também possuem elevado risco associado ao polimorfismo descrito para *ERCC2/XPD*, dentre as quais, cilindrúria, leucocitúria, hematúria, elevação da creatinina e nefrites. Além disso, todos os pacientes com genótipo A/C para o polimorfismo Lys751Gln no gene *ERCC2/XPD* apresentaram síndrome nefrótica, o que evidencia a influência do gene na manifestação clínica renal no LES.

6. REFERÊNCIAS

Abdulrahman, W., Iltis, I., Radu, L., Braun, C., Maglott-Roth, A., Giraudon, C., Egly, J.-M., Poterszman, A., 2013. ARCH domain of XPD, an anchoring platform for CAK that conditions TFIIH DNA repair and transcription activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E633-E642.

Aringer, M., Kuhn, A., 2014. Skin Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Skin Manifestations in Rheumatic Disease*. Springer, pp. 217-230.

Ball, E.M., Bell, A.L., 2012. Lupus arthritis—do we have a clinically useful classification? *Rheumatology* 51, 771-779.

Barbhaiya, M., Costenbader, K., 2014. Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 23, 588-595.

Barnado, A., Wheless, L., Meyer, A.K., Gilkeson, G.S., Kamen, D.L., 2014. Pregnancy outcomes among African–American patients with systemic lupus erythematosus compared with controls. *Lupus science & medicine* 1, e000020.

Bassi, C., Xavier, D., Palomino, G., Nicolucci, P., Soares, C., Sakamoto-Hojo, E., Donadi, E., 2008. Efficiency of the DNA repair and polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XRCC4 DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17, 988-995.

Benhamou, S., Sarasin, A., 2002. ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis* 17, 463-469.

Bhattacharyya, S., Helfgott, S.M., 2014. Neurologic Complications of Systemic Lupus Erythematosus, Sjogren Syndrome, and Rheumatoid Arthritis. *Seminars in neurology*, vol. 34, pp. 425-436.

Borba, E., Araujo, D., Bonfá, E., Shinjo, S., 2013. Clinical and immunological features of 888 Brazilian systemic lupus patients from a monocentric cohort: comparison with other populations. *Lupus*, 0961203313490432.

Borchers, A.T., Naguwa, S.M., Shoenfeld, Y., Gershwin, M.E., 2010. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews* 9, A277-A287.

BRASIL, 2013. PORTARIA Nº 100, DE 7 DE FEVEREIRO DE 2013. In: SAÚDE, M.D. (Ed.). DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO.

Caldecott, K.W., 2003. XRCC1 and DNA strand break repair. DNA repair 2, 955-969.
Chahade, W., Sato, E., Moura, J., Costallat, L., Andrade, L., 1995. Occasional Series: Lupus Around the World Systemic lupus erythematosus in São Paulo/Brazil: a clinical and laboratory overview. Lupus 4, 100-103.

Chan, T.M., 2014. Treatment of severe lupus nephritis: the new horizon. Nature Reviews Nephrology.

Change, G., 2015. Addressing the Ecological Determinants of Health.

Chen, S., Tang, D., Xue, K., Xu, L., Ma, G., Hsu, Y., Cho, S.S., 2002. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of lung cancer in a Chinese population. Carcinogenesis 23, 1321-1325.

Chi, X.-X., Liu, Y.-Y., Shi, S.-N., Cong, Z., Liang, Y.-Q., Zhang, H.-J., 2015. XRCC1 and XPD genetic polymorphisms and susceptibility to age-related cataract: A meta-analysis. Molecular vision 21, 335.

Cho, E.-Y., Hildesheim, A., Chen, C.-J., Hsu, M.-M., Chen, I.-H., Mittl, B.F., Levine, P.H., Liu, M.-Y., Chen, J.-Y., Brinton, L.A., 2003. Nasopharyngeal carcinoma and genetic polymorphisms of DNA repair enzymes XRCC1 and hOGG1. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 12, 1100-1104.

Coin, F., Bergmann, E., Tremeau - Bravard, A., Egly, J.M., 1999. Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. The EMBO Journal 18, 1357-1366.

da Rosa Utiyama, S.R., de Messias Reason, I.T., da Silva Kotze, L.M., 2004. O Sistema Complemento nas Doenças: Genética e Patogenia. Rev Bras Reumatol 44, 277-286.

Deng, Y., Tsao, B.P., 2014. Advances in lupus genetics and epigenetics. Current opinion in rheumatology 26, 482-492.

Desai, N., Cimbaluk, D., Lewis, E., Whittier, W., 2013. Proteinuria in membranous lupus nephritis: the pathology is in the podocyte. Lupus, 0961203313477225.

Engstrom, J.U., Suzuki, T., Kmiec, E.B., 2009. Regulation of targeted gene repair by intrinsic cellular processes. *Bioessays* 31, 159-168.

Esdaile, J., Federgreen, W., Quintal, H., Suissa, S., Hayslett, J., Kashgarian, M., 1991. Predictors of one year outcome in lupus nephritis: the importance of renal biopsy. *QJM* 81, 907-918.

Friedberg, E.C., 2003. DNA damage and repair. *Nature* 421, 436-440.

García Tello, A., Villegas Martínez, A., González Fernández, A., 2002. Manifestaciones hematológicas en el lupus eritematoso sistémico. *Anales de Medicina Interna*, vol. 19. SciELO Espana, pp. 53-57.

Guerra, S.G., Vyse, T.J., Graham, D.S.C., 2012. The genetics of lupus: a functional perspective. *enzyme* 2, 3.

Gurevitz, S., Snyder, J., Wessel, E., Frey, J., Williamson, B., 2013. Systemic lupus erythematosus: a review of the disease and treatment options. *The Consultant Pharmacist* 28, 110-121.

Hu, J.J., 2004. Genetic variations in DNA Repair. *DNA Repair in Cancer Therapy*. Springer, pp. 339-351.

Inês, L., Silva, C., Galindo, M., López - Longo, F.J., Terroso, G., Romão, V.C., Rúa - Figueroa, I., Santos, M.J., Pego - Reigosa, J.M., Nero, P., 2014. Classification of Systemic lupus erythematosus: Systemic Lupus International Collaborating Clinics versus American College of Rheumatology criteria. *Arthritis care & research*.

Iturry-Yamamoto, G., Portinho, C., 2001. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. *Revista da Associação Médica Brasileira* 47, 41-51.

Jahantigh, D., Salimi, S., Mousavi, M., Moossavi, M., Mohammadoo-Khorasani, M., Narooei-nejad, M., Sandoughi, M., 2015. Association Between Functional Polymorphisms of DNA Double-Strand Breaks in Repair Genes XRCC5, XRCC6 and XRCC7 with the Risk of Systemic Lupus Erythematosus in South East Iran. *DNA and cell biology* 34, 360-366.

Jaspers, N., 1997. DNA Repair: Genes, Enzymes, Patients, and Mouse Models. *Risk and Progression Factors in Carcinogenesis*. Springer, pp. 329-335.

Krawczak, M., Cooper, D.N., 1991. Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Human genetics* 86, 425-441.

Kuper, J., Braun, C., Elias, A., Michels, G., Sauer, F., Schmitt, D.R., Poterszman, A., Egly, J.-M., Kisker, C., 2014. In TFIIH, XPD helicase is exclusively devoted to DNA repair.

Lamerdin, J.E., Stilwagen, S.A., Ramirez, M.H., Stubbs, L., Carrano, A.V., 1996. Sequence Analysis of the ERCC2 Gene Regions in Human, Mouse, and Hamster Reveals Three Linked Genes. *Genomics* 34, 399-409.

Lee, H., Bae, S., 2010. What can we learn from genetic studies of systemic lupus erythematosus? Implications of genetic heterogeneity among populations in SLE. *Lupus* 19, 1452-1459.

Liang, G., Xing, D., Miao, X., Tan, W., Yu, C., Lu, W., Lin, D., 2003. Sequence variations in the DNA repair gene XPD and risk of lung cancer in a Chinese population. *International journal of cancer* 105, 669-673.

Lin, Y., Wan, L., Huang, C., Chen, S., Huang, Y., Lai, C., Lin, W., Liu, H., Wu, Y., Chen, C., 2009. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and associations with systemic lupus erythematosus risk in the Taiwanese Han Chinese population. *Lupus*.

Martínez-Martínez, M.U., Borjas-García, J.A., Magaña-Aquino, M., Cuevas-Orta, E., Llamazares-Azuara, L., Abud-Mendoza, C., 2012. Renal function assessment in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international* 32, 2293-2299.

Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., 1998. XRCC1 is specifically associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Molecular and cellular biology* 18, 3563-3571.

Matullo, G., Peluso, M., Polidoro, S., Guarrera, S., Munnia, A., Krogh, V., Masala, G., Berrino, F., Panico, S., Tumino, R., 2003. Combination of DNA repair gene single nucleotide polymorphisms and increased levels of DNA adducts in a population-based study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 12, 674-677.

Mavrogeni, S., Bratis, K., Markussis, V., Spargias, C., Papadopoulou, E., Papamentzelopoulos, S., Constadoulakis, P., Matsoukas, E., Kyrou, L., Kolovou, G.,

2013. The diagnostic role of cardiac magnetic resonance imaging in detecting myocardial inflammation in systemic lupus erythematosus. Differentiation from viral myocarditis. *Lupus* 22, 34-43.

Melo, A.K.G.d., Avelar, A.B., Maegawa, F.K.M., Souza, B.D.B.d., 2009. Avaliação de 100 pacientes com nefrite lúpica acompanhados por dois anos. *Revista Brasileira de Reumatologia* 49, 8-19.

Mitjavila, F., Pac, V., Moga, I., Poveda, R., Vidaller, A., Carrera, M., Pujol, R., 1996. Clinicopathological correlations and prognostic factors in lupus nephritis. *Clinical and experimental rheumatology* 15, 625-631.

Mitra, A., Singh, N., Garg, V., Chaturvedi, R., Sharma, M., Rath, S., 2009. Statistically significant association of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs13181 (ERCC2) with predisposition to Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck (SCCHN) and Breast cancer in the north Indian population. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 28, 104.

Mohan, C., Putterman, C., 2015. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nature Reviews Nephrology* 11, 329-341.

Mok, C.C., Ying, K.Y., Ng, W.L., Lee, K.W., To, C.H., Lau, C.S., Wong, R.W.S., Au, T.C., 2006. Long-term outcome of diffuse proliferative lupus glomerulonephritis treated with cyclophosphamide. *The American journal of medicine* 119, 355. e325-355. e333.

Ni, J., Qiu, L., Hu, L., Cen, H., Zhang, M., Wen, P., Wang, X., Pan, H., Ye, D., 2014. Lung, liver, prostate, bladder malignancies risk in systemic lupus erythematosus: evidence from a meta-analysis. *Lupus*, 0961203313520060.

Nissar, S., Lone, T.A., Banday, M.Z., Rasool, R., Chowdri, N.A., Parray, F.Q., Abdullah, S., Sameer, A.S., 2013. Arg399Gln polymorphism of XRCC1 gene and risk of colorectal cancer in Kashmir: a case control study. *Oncology letters* 5, 959-963.

O'Brien, J., Stephen, M.M., Castillo, J.J., 2013. Lupus Increases The Incidence Ratio Of Hematologic Malignancies: A Meta-Analysis Of Cohort Studies. *Blood* 122, 2948-2948.

Patel, S., Korbet, S., Lewis, E., 2011. The prognosis of severe lupus nephritis based on the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study estimated glomerular filtration rate. *Lupus* 20, 256-264.

Rajaraman, P., Hutchinson, A., Wichner, S., Black, P.M., Fine, H.A., Loeffler, J.S., Selker, R.G., Shapiro, W.R., Rothman, N., Linet, M.S., 2010. DNA repair gene polymorphisms and risk of adult meningioma, glioma, and acoustic neuroma. *Neuro-oncology* 12, 37-48.

Rekvig, O.P., 2015. The anti-DNA antibody: origin and impact, dogmas and controversies. *Nature Reviews Rheumatology*.

Rezende, G., Viana, V., Malheiros, D., Borba, E., Silva, N., Silva, C., Leon, E., Noronha, I., Bonfa, E., 2014. Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria? *Lupus* 23, 255-262.

Rodrigues, M.S., Machado, C.A., Pagnoncelli, D., Avvad, E., Paixão, J.C.d., Gallo, C.V.d.M., 2011. TP53 and XRCC1 polymorphisms and breast cancer prognosis: a case-case study. *Clinics* 66, 1097-1100.

Rossit, A.R.B., Cabral, I.R., Hackel, C., Rita de Cássia, M., Froes, N.v.D.C., Abdel-Rahman, S.Z., 2002. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. *Cancer letters* 180, 173-182.

Rothfield, N., Sontheimer, R.D., Bernstein, M., 2006. Lupus erythematosus: systemic and cutaneous manifestations. *Clinics in dermatology* 24, 348-362.

Rutter, M., Silberg, J., 2002. Gene-environment interplay in relation to emotional and behavioral disturbance. *Annual review of psychology* 53, 463-490.

Santana, N.S., Spegiorin, L.C.J.F., Ferreira, C.P., Vaz-Oliani, D.C.M., Oliani, A.H., de Godoy, J.M.P., de Mattos, C.C.B., de Mattos, L.C., 2015. Anticardiolipin antibodies and recurrent spontaneous abortion in Brazilian women. *Scientia Medica* 25.

Sauma, M.d.F.L.d., Nunes, N.A.C., Lopes, L.F.d.M., 2004. Estudo retrospectivo das manifestações clínicas e laboratoriais de 104 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), em Belém, PA, Brasil (1990-1999). *Rev bras reumatol* 44, 192-197.

Seibold, P., Behrens, S., Schmezer, P., Helmbold, I., Barnett, G., Coles, C., Yarnold, J., Talbot, C.J., Imai, T., Azria, D., 2015. XRCC1 polymorphism associated with late toxicity after radiotherapy in breast cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*.

Sokalski, D., Spring, T.C., Roberts, W., 2013. Large artery inflammation in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 0961203313492241.

Stefanini, M., Botta, E., Lanzafame, M., Orioli, D., 2010. Trichothiodystrophy: from basic mechanisms to clinical implications. *DNA repair* 9, 2-10.

Sutton, E.J., Davidson, J.E., Bruce, I.N., 2013. The systemic lupus international collaborating clinics (SLICC) damage index: a systematic literature review. *Seminars in arthritis and rheumatism*, vol. 43. Elsevier, pp. 352-361.

Thompson, L., Brookman, K., Jones, N., Allen, S., Carrano, A., 1990. Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Molecular and Cellular Biology* 10, 6160-6171.

Tiskievicz, F., Mallmann, E.S., Brenol, J.C., Xavier, R.M., Spritzer, P.M., 2011. Prolactin, estradiol and anticardiolipin antibodies in premenopausal women with systemic lupus erythematosus: a pilot study. *Revista brasileira de reumatologia* 51, 460-464.

Trabulus, S., Guven, G.S., Altiparmak, M.R., Batar, B., Tun, O., Yalin, A.S., Tunckale, A., Guven, M., 2012. DNA repair XRCC1 Arg399Gln polymorphism is associated with the risk of development of end-stage renal disease. *Molecular biology reports* 39, 6995-7001.

Troldborg, A., Thiel, S., Laska, M.J., Deleuran, B., Jensenius, J.C., Stengaard-Pedersen, K., 2015. Levels in Plasma of the Serine Proteases and Associated Proteins of the Lectin Pathway Are Altered in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of rheumatology*, jrheum. 141163.

Wang, X., Zhang, Y., Nilsson, C.L., Berven, F.S., Andrén, P.E., Carlsohn, E., Malm, J., Fuentes, M., Végvári, Á., Welinder, C., 2015. Association of chromosome 19 to lung cancer genotypes and phenotypes. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1-10.

Wang, Y., Spitz, M.R., Zhu, Y., Dong, Q., Shete, S., Wu, X., 2003. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA repair* 2, 901-908.

Warchoń, T., Mostowska, A., Lianeri, M., Łącki, J.K., Jagodziński, P.P., 2012. XRCC1 Arg399Gln gene polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in the Polish population. *DNA and cell biology* 31, 50-56.

Xiong, T., Yang, J., Wang, H., Wu, F., Liu, Y., Xu, R., Lv, Z., Xue, P., Cao, W., Zhang, Y., 2014. The association between the Lys751Gln polymorphism in the XPD gene and the risk of bladder cancer. *Molecular biology reports* 41, 2629-2634.

Zandman-Goddard, G., Solomon, M., Rosman, Z., Peeva, E., Shoenfeld, Y., 2012. Environment and lupus-related diseases. *Lupus* 21, 241-250.

Zhou, J., Liu, Z.-y., Li, C.-b., Gao, S., Ding, L.-h., Wu, X.-l., Wang, Z.-y., 2015. Genetic polymorphisms of DNA repair pathways influence the response to chemotherapy and overall survival of gastric cancer. *Tumor Biology* 36, 3017-3023.

Zhou, W., Liu, G., Miller, D.P., Thurston, S.W., Xu, L.L., Wain, J.C., Lynch, T.J., Su, L., Christiani, D.C., 2003. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 12, 359-365.

ANEXO I



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER Nº 309/2009

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 353/09 – POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

Validade do Parecer: 03/11/2011

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 03 de novembro de 2009.

Atenciosamente.

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES
Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-904

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE